

**This Page Is Inserted by IFW Operations
and is not a part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- **BLACK BORDERS**
- **TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- **FADED TEXT**
- **ILLEGIBLE TEXT**
- **SKEWED/SLANTED IMAGES**
- **COLORED PHOTOS**
- **BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS**
- **GRAY SCALE DOCUMENTS**

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

**As rescanning documents *will not* correct images,
please do not report the images to the
Image Problem Mailbox.**



①⑨ BUNDESREPUBLIK
DEUTSCHLAND



DEUTSCHES
PATENT- UND
MARKENAMT

①⑫ **Offenlegungsschrift**
①⑩ **DE 198 03 415 A 1**

⑤① Int. Cl.⁶:
B 01 D 15/08
C 07 B 63/00
G 01 N 30/00
G 01 N 30/48

②① Aktenzeichen: 198 03 415.6
②② Anmeldetag: 29. 1. 98
④③ Offenlegungstag: 5. 8. 99

DE 198 03 415 A 1

⑦① Anmelder:
Aventis Research & Technologies GmbH & Co KG,
65929 Frankfurt, DE

⑦② Erfinder:
Bengs, Holger, Dr., 60598 Frankfurt, DE; Schneller,
Arnold, Dr., 64409 Messel, DE; Böhm, Gitta, 60439
Frankfurt, DE; Andert, Doris, Dr., 65428
Rüsselsheim, DE

⑤⑥ Entgegenhaltungen:
EP 03 21 597 A1
EP 03 04 161 A2

Die folgenden Angaben sind den vom Anmelder eingereichten Unterlagen entnommen

Prüfungsantrag gem. § 44 PatG ist gestellt

⑤④ Trennung von Stoffgemischen unter Einsatz von Polysacchariden

⑤⑦ Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur chromatographischen Trennung von Stoffgemischen unter Einsatz von sphärischen Mikropartikeln aus chemisch und physikalisch unmodifizierten, wasserunlöslichen, linearen Polysacchariden.

*gamp as
WD 29/36 594*

DE 198 03 415 A 1

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Trennung von Stoffgemischen, insbesondere Enantiomeren, unter Einsatz von Polysacchariden als Trennmateriale.

Die Chromatographie ist eine effektive Methode zur vollständigen Trennung von Komponenten einer Mischung, insbesondere zur Auftrennung von Mischungen ähnlicher Verbindungen, z. B. von Stereoisomeren. Aufgrund des steigenden Interesses an reinen Enantiomeren für pharmazeutisch und biochemisch wirksame Substanzen und Pflanzenschutzmittel ist die chromatographische Trennung enantiomerer Verbindungen von besonderem Interesse. Für die Aufreinigung dieser Verbindungen werden ständig verbesserte Verfahren entwickelt und bessere Trennmateriale gesucht, insbesondere auf der Basis der Polysaccharide Cellulose und Stärke, zwei leicht zugänglichen und kostengünstigen Polymeren mit chiralen Atomen.

So schildert der Artikel Chromatographie 65, LaborPraxis, 730-738 (1990) die Verwendung von mikrokristalliner Tribenzoylcellulose mit Korngrößen von 10 bis 20 µm im Vergleich zu Triacetylcellulose als Sorbens für die Enantiomeren-trennung in der Chromatographie. Beide Substanzen können für analytische und präparative Trennungen verwendet werden. Sie sind durch Derivatisierung von Cellulose zugänglich. Unmodifizierte Polymere kommen nicht zum Einsatz. Die Einführung kleinerer Korngrößen bis zu 5 µm, um Totvolumina und eine im Verlauf des Betriebs auftretende Verdichtung der Säule zu vermeiden, wird als wünschenswert beschrieben.

Auch WO 95/05 879 behandelt die Trennung von Enantiomeren durch Flüssigkeitschromatographie. Besondere Aufmerksamkeit wird hier der mobilen Phase zur Verbesserung der Trennleistung gewidmet. Als stationäre Phase werden Carbamat-Derivate von Cellulose und Amylose und Ester-Derivate von Cellulose verwendet.

DE-A 43 17 139 beschreibt ein spezielles Verfahren zur Enantiomerentrennung von Inhalationsanästhetika mittels präparativer Gaschromatographie. Als stationäre Phase werden mit Estergruppierungen derivatisierte Cyclodextrine in Polysiloxanlösung auf porösem Trägermaterial (Chromosorb) verwendet. Um geeignetes Trennmateriale zu erhalten, müssen die Cyclodextrine chemisch modifiziert, in Polysiloxan gelöst und auf einem geeigneten Trägermaterial fixiert werden.

Auch in US 5,403,898 werden Cyclodextrinderivate enthaltende polymere Siloxane als chirale stationäre Phase in der analytischen und präparativen Gaschromatographie (GC), Chromatographie mit superkritischen Flüssigkeiten (SFC) und Flüssigkeits-Chromatographie (LC) eingesetzt. Diese Peralkyl-Cyclodextrine werden chemisch an die Polysiloxane gebunden. Das verwendete Material wird also durch chemische Modifizierung der Cyclodextrine und anschließende chemische Fixierung an Polysiloxane erhalten.

In US 5,302,633 wird, um eine Unlöslichkeit der chiralen stationären Phase zu erreichen, ein Vinylderivat eines Polysaccharids (z. B. Cellulose) auf der Oberfläche eines porösen Trägers (z. B. Kieselgel) erst adsorbiert, dann polymerisiert. Eine zweite Variante ist die Copolymerisation eines Vinylgruppen enthaltenden porösen Trägers (z. B. modifiziertes Kieselgel) mit einem Vinylderivat eines Polysaccharids. Auch hier sind chemische Modifizierungen notwendig, um geeignetes Trennmateriale zu erhalten.

EP-B-0 157 365 beschreibt stationäre Phasen zur Enantiomeren- und Isomerentrennung und für die Gelpermeationschromatographie auf der Basis von Polysaccharid-Carbamat-Derivaten. Als Polysaccharide sind Cellulose, Amylose, Chitosan, Xylan, Dextran und Inulin geeignet. Hierbei kann das hergestellte Pulver mit einem Partikeldurchmesser von 1 µm bis 300 µm direkt oder nach physikalischer oder chemischer Fixierung auf einem porösen Träger eingesetzt werden. Es ist also eine chemische Modifizierung notwendig, um geeignetes Trennmateriale zu erhalten.

In DE-C 26 55 292 und DE-C 26 55 361 werden poröse Gele aus Dextranderivaten als Trennungsmaterialien eingesetzt. Um eine Unlöslichkeit zu erzielen, müssen vinylgruppenhaltige Dextranderivate durch radikalische Polymerisation vernetzt werden.

Es sind also bereits zahlreiche Polysaccharide bekannt, die in chromatographischen Trennverfahren eingesetzt werden. Diese müssen jedoch immer, um eine gute Trennleistung, Korngrößenverteilung, Lösungsmittelstabilität und -resistenz zu erzielen, chemisch und/oder physikalisch modifiziert werden. Dies ist immer mit einer Erhöhung der Kosten verbunden.

Unter chemischen und/oder physikalischen Modifizierungen sind insbesondere Derivatisierungen durch die Einführung spezieller Gruppen, kovalente Fixierungen auf einem Trägermaterial sowie nachträgliche chemische und/oder physikalische Vernetzungen zu verstehen.

Aufgabe der Erfindung ist daher eine Vereinfachung und Verbilligung des Chromatographieverfahrens durch Umgehung von chemischen und physikalischen Modifizierungen des eingesetzten Chromatographiematerials.

Diese Aufgabe wird durch ein Verfahren zur chromatographischen Trennung von Stoffgemischen unter Einsatz von sphärischen Mikropartikeln aus chemisch und physikalisch unmodifizierten, wasserunlöslichen, linearen Polysacchariden als Trennmateriale gelöst.

Unter sphärischen Mikropartikeln sind Mikropartikel, die annähernd Kugelform besitzen, zu verstehen. Bei Beschreibung einer Kugel durch von einem gemeinsamen Ursprung ausgehende, in den Raum gerichtete Achsen gleicher Länge, die den Radius der Kugel in allen Raumrichtungen definieren, ist für die sphärischen Mikropartikel eine Abweichung der Achsenlängen vom Idealzustand der Kugel von 1% bis 40% möglich. Bevorzugt werden sphärische Mikropartikel mit Abweichungen bis 25%, besonders bevorzugt bis 15% erhalten. Die Oberfläche der sphärischen Mikropartikel kann makroskopisch mit der einer Himbeere verglichen werden, wobei die Tiefe der "Eindellungen" oder "Einschnitte" maximal 20% des mittleren Durchmessers der sphärischen Mikropartikel betragen soll. Die Fig. 1a bis d zeigen Rasterelektronenmikroskopaufnahmen (REM) (Camscan S-4) der verwendeten sphärischen Mikropartikel.

1a: Rasterelektronenmikroskopaufnahme der verwendeten sphärischen Mikropartikel in 5000x Vergrößerung

1b: Rasterelektronenmikroskopaufnahme der verwendeten sphärischen Mikropartikel in 10000x Vergrößerung

1c: Rasterelektronenmikroskopaufnahme der verwendeten sphärischen Mikropartikel in 5000x Vergrößerung

1d: Rasterelektronenmikroskopaufnahme der verwendeten sphärischen Mikropartikel in 20000x Vergrößerung

Durch die Umgehung von chemischen und physikalischen Modifizierungen der linearen Polysaccharide können zusätz-

liche kostenintensive Verfahrensschritte vermieden und dadurch die Wirtschaftlichkeit des Chromatographieverfahrens erhöht werden. Ein weiterer Vorteil ist die sehr gute Reproduzierbarkeit des Chromatographieprozesses.

Unter physikalischen Modifizierungen sind nicht die üblichen Standardprozeduren der Labortätigkeit wie Rühren, Zentrifugieren, Aufschlänmen, Waschen, Filtrieren, Trocknen usw. zu verstehen.

Lineare Polymere gemäß der vorliegenden Erfindung können Polyglucane oder andere lineare Polysaccharide wie Pullulane, Pektine, Mannane oder Polyfructane sein. Besonders bevorzugt ist Poly-(1,4- α -D-glucan). 5

Das Material kann erfindungsgemäß zur chromatographischen Trennung von Substanzgemischen, besonders bevorzugt Stereoisomeren, ganz besonders bevorzugt Enantiomeren eingesetzt werden. Daher ist besonders der Einsatz als Chromatographiematerial in der präparativen und analytischen Chromatographie wie Gaschromatographie, präparativer und analytischer Dünnschichtchromatographie und besonders bevorzugt in der Säulenchromatographie, insbesondere High Performance Liquid Chromatography (HPLC), von Interesse. Weiterhin ist die Verwendung des Materials in der Gelpermeationschromatographie (GPC) bei der Auftrennung von Polymeren verschiedener Molekulargewichte von Interesse. Eine Anwendung, die ebenfalls in den Bereich der Erfindung fällt, ist die Abtrennung von Substanzen aus Lösungen, Emulsionen oder Suspensionen durch spezifische oder unspezifische Wechselwirkungen mit niedermolekularen oder polymeren Verbindungen. Aber auch ionische Verbindungen, insbesondere Metallkationen, sind von Interesse für die Anwendung. Spezielle Effekte sind insbesondere aufgrund der strukturellen Ähnlichkeit zu Polysacchariden bei der Abtrennung von Monosacchariden, Disacchariden und Oligosacchariden erzielbar. Weiterhin ist auch die Behandlung von Wasser, insbesondere Abwasser, die Aufarbeitung und Analyse von Blut, bzw. die Auftrennung bzw. Abtrennung von Erbgutmaterial oder verwandten Verbindungen (z. B. Oligonucleotide, Peptide, Proteine) von Interesse. 10 15

Unter Chromatographie versteht man im Sinne der Erfindung physikalische Trennverfahren, bei denen die Stofftrennung durch Verteilung zwischen einer stationären und einer mobilen Phase geschieht. Eine Einteilung ermöglicht die Kombination der Phasenzustände fest, flüssig und gasförmig für die mobile und stationäre Phase. 20

Unter HPLC (High Performance (oder) High Pressure Liquid Chromatography) ist die Hochleistungs- (oder) Hochdruckflüssigkeitschromatographie zu verstehen. Man arbeitet bei der HPLC mit sehr feinem Material (3–10 μ m), da die Trennleistung einer Säule mit abnehmender Korngröße der stationären Phase zunimmt. Die Feinteiligkeit der Trennmaterialien erfordert hohe Drucke (bis zu 400 bar). 25

Bei der Gelpermeationschromatographie (GPC), auch Ausschlußchromatographie, die auch als HPLC betrieben werden kann, besteht die stationäre Phase aus Perlen mit einem heteroporösen gequollenen Netzwerk, dessen Porengrößenverteilung über mehrere Größenordnungen variiert, so daß die Fraktionierung nach Molekulargröße erfolgt, was die rasche Bestimmung der molekularen Größenverteilung von Polymeren gestattet. 30

Die Gaschromatographie (GC) dient zur Trennung von Stoffgemischen, die gasförmig vorliegen oder sich unzersetzt verdampfen lassen, wobei als mobile Phase ein Gas dient. Die gaschromatographische Analyse beginnt mit dem Aufbringen eines Gases, einer verdampfenden Flüssigkeit oder eines verdampfenden Feststoffes auf die thermostatisierte Trennsäule. Mit Hilfe des Trägergases (He, N₂ oder H₂) werden die Substanzen durch die Säule transportiert, wo die chromatographische Trennung stattfindet. 35

Lineare Polysaccharide sind Polysaccharide, die aus Monosacchariden, Disacchariden oder anderen monomeren Bausteinen (Monomer) derart aufgebaut sind, daß die Monosaccharide, Disaccharide oder anderen monomeren Bausteine stets in der gleichen Art miteinander verknüpft sind. Jede so definierte Grundeinheit oder Baustein hat genau zwei Verknüpfungen, jeweils eine zu einem anderen im Polymer eingebauten "Monomer" (Wiederholungseinheit im Polymer). Davon sind die beiden Grundeinheiten ausgenommen, die den Anfang und das Ende des Polysaccharids bilden. Diese Grundeinheiten haben nur eine Verknüpfung zu einem weiteren "Monomer". Bei drei Verknüpfungen (kovalente Bindungen) spricht man von einer Verzweigung. Verzweigungen treten nicht oder nur in untergeordnetem Maß auf, so daß sie bei sehr kleinen Verzweigungsanteilen den herkömmlichen analytischen Methoden nicht zugänglich sind. 40

Unter naturidentischen Polysacchariden sind dabei Polymere zu verstehen, die entweder so in der Natur nicht auftreten oder aber nur in einer Mischung mit anderen Verbindungen, die auch andere Polymere sein können. Die Herstellung solcher naturidentischen Polymere ist durch Verfahren möglich, die unter den im breitesten Sinn zu definierenden Begriff der bio- und gentechnologischen Verfahren fallen. Darunter sind einerseits biotechnische Verfahren oder Prozesse zu verstehen, wie sie weiter unten definiert werden, aber auch solche, die durch die Verwendung und Modifikation von zum Beispiel Bakterien, Pilzen oder Algen zu entsprechenden Verbindungen führen. Andererseits fallen unter den Begriff aber auch zum Beispiel Polysaccharide, die dadurch zu gewinnen sind, daß bio- oder gentechnische Verfahren auf höhere Pflanzen angewendet werden, so daß eine Separation aus der Pflanze erfolgen kann. Zu solchen Pflanzen gehören insbesondere die Kartoffel, Mais, Getreidearten, Maniok, Reis und Erbsen. Aber auch andere Pflanzen, die Polysaccharide produzieren sind unter dem erfindungsgemäßen Aspekt in diese Kategorie einzuordnen. 45 50

Im Rahmen der Erfindung werden bevorzugt lineare, wasserunlösliche Polysaccharide verwendet, welche in einem biotechnischen, insbesondere einem biokatalytischen, auch biotransformatorischen, oder einem fermentativen Prozeß hergestellt werden. 55

Unter biotechnische Prozesse fallen sämtliche biokatalytischen, (= biotransformatorischen Verfahren, also Verfahren, die mit Enzymen oder in der Kombination mit Organismen, die intra- oder extrazellulär Proteine bilden, die diese Aufgabe übernehmen, durchgeführt werden können) oder fermentative Verfahren, die mit in der Natur vorkommenden oder rekombinanten Organismen durchgeführt werden können. 60

Lineare Polysaccharide hergestellt durch Biokatalyse (auch: Biotransformation) im Rahmen dieser Erfindung bedeutet, daß das lineare Polysaccharid durch katalytische Reaktion von monomeren Grundbausteinen wie oligomeren Sacchariden, z. B. von Mono- und/oder Disacchariden, hergestellt wird, indem ein sogenannter Biokatalysator, üblicherweise ein Enzym, unter geeigneten Bedingungen zum Einsatz für die Umsetzung genutzt wird. 65

Lineare Polysaccharide aus Fermentationen sind im Sprachgebrauch der Erfindung lineare Polysaccharide, die durch fermentative Prozesse unter der Verwendung in der Natur vorkommender Organismen, wie zum Beispiel Pilze, Algen oder Bakterien oder unter der Verwendung von in der Natur nicht vorkommenden Organismen, aber unter Zuhilfenahme von gentechnischen Methoden allgemeiner Definition modifizierten natürlichen Organismen, wie zum Beispiel Pilze, 70

Algen oder Bakterien gewonnen werden oder unter Einschaltung und Mithilfe von fermentativen Prozessen gewonnen werden können.

Darüber hinaus können lineare Polysaccharide zum Erzielen der in der vorliegenden Erfindung beschriebenen Effekte auch dadurch erhalten werden, daß nicht-lineare Polysaccharide, die Verzweigungen enthalten, derart mit einem oder mehreren Enzymen behandelt werden, daß die Verzweigungen vom Rückgrat des Polysaccharids abgespalten werden, so daß nach ihrer Abtrennung lineare Polysaccharide vorliegen. Bei diesen Enzymen handelt es sich beispielsweise um Amylasen, iso-Amylasen, Pullulanasen oder auch Gluconohydrolasen.

Herstellung einheitlicher sphärischer Mikropartikel

10

Das bevorzugt zum Einsatz gelangende Poly-(1,4- α -D-glucan) kann auf verschiedene Weisen hergestellt werden. Eine sehr vorteilhafte Methode wird in der WO 95/31 553 beschrieben. Auf die Offenbarung der Schrift wird sich hier ausdrücklich bezogen. Darin wird das Poly-(1,4- α -D-glucan) mittels eines biokatalytischen (biotransformatorischen) Prozesses mit Hilfe von Amylosucrase hergestellt. Weiterhin kann das Poly-(1,4- α -D-glucan) unter Verwendung von Polysaccharidsynthasen, Stärkesynthasen, Glycoltransferasen, α -1,4-Glucantransferasen, Glycogensynthasen oder Phosphorylasen mittels eines biokatalytischen Prozesses hergestellt werden.

15

Die prioritätsältere nicht-vorveröffentlichte Anmeldung DE-A 197 37 481 beschreibt die Herstellung von sphärischen Mikropartikeln aus linearen wasserunlöslichen Polysacchariden, sowie deren Molekulargewichte und Durchmesser. Auf die oben genannte Anmeldung wird hier Bezug genommen.

20

Die Herstellung der sphärischen Mikropartikel erfolgt durch Lösen des wasserunlöslichen, linearen Polysaccharids, insbesondere des Poly-(1,4- α -D-glucans), in einem Lösungsmittel, besonders bevorzugt in DMSO, Einbringen der Lösung in ein Fällungsmittel, bevorzugt Wasser, Kühlen des dabei entstehenden Gemisches auf vorzugsweise 10°C bis -10°C und Abtrennen der gebildeten Mikropartikel.

25

Durch Mitverwendung geeigneter Zusatzstoffe läßt sich auf die Eigenschaften der Partikel wie Größe, Struktur der Oberfläche, Porosität usw. sowie auf die Prozeßführung Einfluß nehmen. Geeignete Zusatzstoffe sind beispielsweise oberflächenaktive Stoffe wie Natriumdodecylsulfat oder N-Methylgluconamid, Zucker, z. B. Fructose, Saccharose, Glucose.

Eigenschaften der sphärischen Mikropartikel

30

Die Molekulargewichte M_w der erfindungsgemäß verwendeten linearen Polysaccharide können in einem weiten Bereich von 10^3 g/mol bis 10^7 g/mol variieren. Für das vorzugsweise verwendete lineare Polysaccharid Poly-(1,4- α -D-glucan) werden bevorzugt Molekulargewichte M_w im Bereich von 10^4 g/mol bis 10^5 g/mol, insbesondere 2×10^4 g/mol bis 5×10^4 g/mol verwendet. Das Molekulargewicht M_w beschreibt das Gewichtsmittel des Molekulargewichts und wird mittels Gelpermeationschromatographie im Vergleich zu einer Eichung mit Pullulanstandards ermittelt.

35

Die Partikel können mittlere Durchmesser (Zahlenmittelwert) aufweisen wie 1 nm bis 100 μ m, bevorzugt 100 nm bis 10 μ m, besonders bevorzugt 1 μ m bis 5 μ m. Die Verteilung der Durchmesser zeichnet sich durch eine hohe Einheitlichkeit aus.

40

Die Mikropartikel aus Poly-(1,4- α -D-glucan) zeichnen sich durch eine spezifische Oberfläche von 1 m²/g bis 100 m²/g, besonders bevorzugt 3 m²/g bis 10 m²/g aus.

Versuche zur Stabilität der Mikropartikel in verschiedenen Lösungsmitteln zeigen, daß eine große Vielfalt an Lösungsmitteln für den Einsatz in dem erfindungsgemäßen Chromatographieverfahren geeignet sind. Als Lösungsmittel, in Funktion des Elutionsmittels, werden z. B. n-Hexan, Dichlormethan, Tetrahydrofuran, 1,4-Dioxan, Ethanol, Aceton, Acetonitril, Methanol, n-Heptan und Wasser verwendet.

45

Chromatographieverfahren

50

Im Chromatographieverfahren werden erfindungsgemäß Mikropartikel aus linearen Polysacchariden, besonders bevorzugt Poly-(1,4- α -D-glucan), insbesondere in einem Lösungsmittel, z. B. n-Heptan, aufgeschlämmt, mittels eines Ultraturax aufgewirbelt und im Ultraschallbad entgast. Die Suspension wird in eine Säule gefüllt und durch ständiges Klopfen an der Säule, ständiges Schütteln in Kombination mit kurzzeitiger Behandlung im Ultraschallbad gleichmäßig und dicht gepackt, so daß totvolumenarme Packungen entstehen. Die Trennungen werden in einer dem Stand der Technik entsprechenden Chromatographie-Anlage für die HPLC durchgeführt. Dabei beträgt die Probenkonzentration 2,0 bis 0,025 mg/l Lösungsmittel, besonders bevorzugt 0,25 bis 0,05 mg/l Lösungsmittel. Die Elutionsgeschwindigkeit beträgt 2,0 bis 0,25 ml/min, bevorzugt 1,0 bis 0,4 ml/min, besonders bevorzugt 0,5 ml/min. Diese Angaben können in Abhängigkeit von dem verwendeten Lösungsmittel variieren. Die verwendeten Drucke sind stark von der Polarität des Lösungsmittels abhängig. Sie liegen i. a. in einem Bereich zwischen 30 bar und 200 bar. Es wurden beispielsweise die folgenden Drucke gemessen: 138 bis 159 bar für Acetonitril, etwa 100 bar für Essigester, etwa 62 bar für t-Butyl-methylether und 54 bis 70 bar für n-Heptan. Es kann ein innerer Standard, z. B. 1,3,5-Tri-tert-butylbenzol, verwendet werden.

60

Die nachfolgenden Beispiele erläutern die Erfindung näher.

Beispiel 1

65

In-vitro-Produktion eines linearen wasserunlöslichen Polysaccharids in einem biokatalytischen Prozeß am Beispiel des Poly-(1,4- α -D-glucose) mit Amylosucrase.

In ein sterilisiertes (Dampfsterilisation) 15 l Gefäß werden 10 l einer 20 %igen Saccharose Lösung gegeben. Der Enzymextrakt, Amylosucrase enthaltend, wird in einer Portion zugegeben. Die Enzymaktivität beträgt in diesem Experiment 20 units (1 unit = 1 μ mol Saccharose \times min⁻¹ \times mg Enzym). Die Apparatur wird mit einem ebenfalls sterilisierten

KPG-Rührer versehen. Das Gefäß wird verschlossen, bei 37°C aufbewahrt und gerührt. Bereits nach einer Zeit von wenigen Stunden bildet sich ein weißer Niederschlag. Die Reaktion wird nach einer Zeitdauer von 96 Stunden beendet. Der Niederschlag wird abfiltriert und zur Abtrennung niedermolekularer Zucker mehrfach mit Wasser gewaschen. Der im Filter verbleibende Rückstand wird bei 40°C im Trockenschrank unter Anlegung eines Vakuums mit Hilfe einer Membranpumpe (Firma Vacuubrand GmbH & Co, CVC 2) getrocknet. Die Masse beträgt 651 g (Ausbeute 65%).

5

Beispiel 2

Bestimmung des Molekulargewichts des mit Amylosucrase synthetisierten wasserunlöslichen Poly-(1,4- α -D-glucans) aus Beispiel 1

10

Es werden 2 mg des Poly-(1,4- α -D-glucans) aus Beispiel 1 bei Raumtemperatur in Dimethylsulfoxid (DMSO, p.a. von Riedel-de-Haen) gelöst und filtriert (2 μ m Filter). Ein Teil der Lösung wird in eine Gelpermeationschromatographie Säule injiziert. Als Elutionsmittel wird DMSO verwendet. Die Signalintensität wird mittels eines RI-Detektors gemessen und gegen Pullulanstandards (Firma Polymer Standard Systems) ausgewertet. Die Flußrate beträgt 1.0 ml pro Minute. Die Messung ergibt ein Zahlenmittel des Molekulargewichts (M_n) von 7.000 g/mol und ein Gewichtsmittel des Molekulargewichts (M_w) von 34.000 g/mol.

15

Beispiel 3

20

Herstellung von Mikropartikeln aus Poly-(1,4- α -D-glucan)

a) 400 g Poly-(1,4- α -D-glucan) werden in 2 l Dimethylsulfoxid (DMSO, p.a. von Riedel-de-Haen) bei 60°C innerhalb von 1,5 h gelöst. Dann wird eine Stunde bei Raumtemperatur gerührt. Die Lösung wird in 20 l bidestilliertem Wasser unter Rühren durch einen Tropftrichter über einen Zeitraum von 2 h hinzugegeben. Der Ansatz wird für 44 h bei 4°C gelagert. Es bildet sich eine feine Suspension aus. Die Partikel werden abgetrennt, indem zunächst der Überstand abdekantiert wird. Der Bodensatz wird aufgeschlämmt und in kleinen Portionen zentrifugiert (Ultrazentrifuge RC5C: je 5 Minuten bei 5000 Umdrehungen pro Minute). Der feste Rückstand wird insgesamt drei Mal mit bidestilliertem Wasser aufgeschlämmt und erneut zentrifugiert. Die Feststoffe werden gesammelt und die Suspension von ca. 1000 ml gefriergetrocknet (Christ Delta 1-24 KD). Es werden 283 g weißer Feststoff isoliert (Ausbeute 71%).

25

b) Die gesammelten Überstände werden bei einer Temperatur von 18°C über Nacht verwahrt. Die Aufarbeitung erfolgt wie beschrieben. Es werden weitere 55 g des weißen Feststoffs isoliert (Ausbeute 14%).

30

Die Gesamtausbeute dieses Prozesses beträgt somit 85%.

Beispiel 4

35

Untersuchungen der Mikropartikel aus dem Beispiel 3 mittels Elektronenmikroskopie

Zur Charakterisierung der Partikel werden Rasterelektronenmikroskopaufnahmen (REM) (Camscan S-4) durchgeführt. Die Fig. 1a bis d zeigen Aufnahmen der Partikel, die verdeutlichen, daß es sich um sphärische, sehr einheitliche Partikel hinsichtlich der Form, Größe und Oberflächenrauigkeit handelt.

40

Beispiel 5

Untersuchungen der Größenverteilungen der Partikel aus Beispiel 3

45

Zur Charakterisierung der Größenverteilungen der Partikel aus den Beispielen 3 wurden Untersuchungen mit einem Mastersizer durchgeführt (Fa. Malvern Instruments). Die Untersuchung erfolgte im Fraunhofer Modus (Auswertung: multimodal, Anzahl) unter Annahme einer Dichte von 1,080 g/cm³ und einer Volumenkonzentration im Bereich von 0,012% bis 0,014%.

50

55

60

65

Tabelle 1

Charakterisierung der Partikeldurchmesser aus den Beispielen 3

Beispiel I	Durchmesser			Partikelverteilung		
No.	dn^{*1} (μm)	dw^{*2} (μm)	dw / dn^{*3}	$d(10\%)^{*4}$ (μm)	$d(50\%)^{*5}$ (μm)	$d(90\%)^{*6}$ (μm)
3a	1,664	4,184	2,541	0,873	1,504	2,624
3b	0,945	2,345	2,481	0,587	0,871	1,399

*¹ d_n : Zahlenmittelwert des Durchmessers

*² d_w : Gewichtsmittelwert des Durchmessers

*³ d_w / d_n : Dispersität der Partikeldurchmesser

*⁴ $d(10\%)$: 10 % aller Partikel haben einen kleineren Durchmesser als der angegebene Wert

*⁵ $d(50\%)$: 50 % aller Partikel haben einen kleineren Durchmesser als der angegebene Wert

*⁶ $d(90\%)$: 90 % aller Partikel haben einen kleineren Durchmesser als der angegebene Wert

Beispiel 6

Bestimmung der spezifischen Oberfläche von Poly-(1,4- α -D-glucan) (Vergleichsbeispiel) und Mikropartikeln aus Poly-(1,4- α -D-glucan) und Kartoffelstärke (Vergleichsbeispiel)

Die Messungen der spezifischen Oberfläche werden mit einem Sorptomatic 1990 (Fa. Fisons Instruments) hergestellt. Zur Auswertung wird die "default method sorptomatic"-Methode angewendet. Für die Untersuchung werden die Proben bei 80°C im Vakuum (Membranpumpe der Firma Vacuubrand GmbH & Co, CVC 2) über Nacht getrocknet. Die Kartoffelstärke und das direkt aus der Biotransformation gewonnene Poly-(1,4- α -D-glucan) werden zuvor gemahlen, so daß die Masse der Partikel im Bereich kleiner 200 Mikrometer liegt. Hierzu wird eine handelsübliche Mühle verwendet (Fa. Waring®).

Tabelle 2

Charakterisierung der spezifischen Oberfläche der Mikropartikel aus Poly-(1,4- α -D-glucan) (siehe Beispiel 3)

Beispiel No.	Substanz	spezifische Oberfläche m ² /g
1	Poly-(1,4- α -D-glucan)	2,243
3	Mikropartikel aus Poly-(1,4- α -D-glucan)	4,527
-	Kartoffelstärke (Toffena, Fa. Südstärke)	1,280

Beispiel 7

Versuche zur Stabilität der Mikropartikel in verschiedenen Lösungsmitteln zur Bestimmung der verwendbaren Lösungsmittel

Zur Austestung der Eignung verschiedener Lösungsmittel in der chromatographischen Anwendung mit Mikropartikeln aus Poly-(1,4- α -D-glucan) wird wie folgt verfahren: 100 mg der Partikel aus Beispiel 3 werden in einem Rollrandgläschen mit jeweils 3 ml des Lösungsmittels überschichtet. Die Beobachtungszeit beträgt 24 Stunden. In stundenweisen Abständen werden die Partikel nach Veränderungen untersucht. Zu diesem Zweck wird das Reaktionsgefäß geschwenkt.

Die Ergebnisse zeigen, daß eine hohe Vielfalt an Lösungsmitteln für die hier beschriebene chromatographische Verwendung zum Einsatz kommen kann. Auszuschließen sind nur Toluol, Essigester und Dimethylsulfoxid. Im nicht aufgeführten Einzelfall muß das Lösungsmittel zunächst auf seine Verwendbarkeit hin überprüft werden. Die Ergebnisse der Versuche sind in Tabelle 3 festgehalten. Dabei wurden die Dielektrizitätskonstanten, sowie das Dipolmoment und/oder der Polaritätsindex nach Snyder angegeben, um einen Anhaltspunkt für die Polarität des Lösungsmittels zu geben.

Tabelle 3

Ergebnisse der Untersuchungen zur Stabilität von Mikropartikeln aus Poly-(1,4- α -D-glucan) (siehe Beispiel 3) in verschiedenen Lösungsmitteln

5

10

15

20

25

30

35

40

Lösungsmittel	Dielektrizitätskonstante (ϵ)* ¹	Dipolmoment D* ²	Polaritätsindex* ³	Beobachtung (nach 24 h)
n-Hexan	1,8865	—	0,0	keine Veränderung
n-Heptan	1,9209	—	0,0	keine Veränderung
Toluol	2,379	0,375	2,3	transparent, leicht gequollenes Material, trüber Überstand
Essigester	6,0814	1,78	—	Partikel verkleben, trüber Überstand
Dichlormethan	8,93	1,60	3,4	keine Veränderung
Tetrahydrofuran	7,2	1,75	4,2	keine Veränderung
1,4-Dioxan	2,2189	—	4,8	keine Veränderung
Ethanol	25,3	1,69	5,2	keine Veränderung
Aceton	21,01	2,88	5,4	keine Veränderung
Acetonitril	36,64	3,924	6,2	keine Veränderung
Methanol	33,0	1,7	6,6	keine Veränderung
Dimethylformamid	38,25	3,82	—	keine Veränderung
Dimethylsulfoxid	47,24	3,96	—	gelöst
Wasser	80,100	1,854	9,0	keine Veränderung

45

*¹ Dielektrizitätskonstante nach „Handbook of Chemistry and Physics, 77th Edition

*² Dipolmoment nach „Handbook of Chemistry and Physics, 77th Edition

50

*³ Polaritätsindex nach Snyder aus: Merck, ChromBook

Beispiel 8

55

Füllen einer Chromatographiesäule mit Mikropartikeln aus Beispiel 3a

60

5 g der Partikel aus Beispiel 3a werden in ca. 60 ml Heptan aufgeschlämmt. Mittels eines Ultraturrax (Fa. Ika) wird die Suspension kurz aufgewirbelt und anschließend in einem Ultraschallbad (Sonorex Super RK510H) entgast. Die Suspension wird dann unter Maximalfluß in eine Säule mit den Maßen 125 mm Länge und 4 mm Durchmesser (Hibar® Fertigsäule der Firma Merck AG) gefüllt. Ständiges Klopfen an der Säule, bzw. ständiges Schütteln der Säule in Kombination mit kurzzeitiger, etwa einminütiger Behandlung im Ultraschallbad gewährleistet eine dichte und gleichmäßige Packung des Trennmateri- als, so daß totvolumenarme Packungen entstehen.

65

Beispiel 9

Trennung von Indol und 2-Methylindol in Heptan

Die Trennungen werden in einer Chromatographie-Anlage Lichograph® der Firma Merck durchgeführt. Die einzelnen Bauteile sind: eine Gradientenpumpe L 6200 A, ein UV-Detektor L-4000 (Messung bei 254 nm), ein Chromato-Integrator D-2500 und eine Trennsäule Hibar® Fertigsäule RT-125-4. Die Probenkonzentration beträgt idealerweise 0,05 bis 0,1 mg/ml Lösungsmittel. Als innerer Standard kann 1,3,5-Tri-tert.-butylbenzol (Fa. Fluka) verwendet werden.

Die Chromatographiesäule ist mit n-Heptan (Aldrich zur HPLC) vorbereitet. Die Anlage wird mit n-Heptan gefahren. Die Elutionsgeschwindigkeit beträgt 0,5 ml/min. Der Druck beträgt 54 bar. Die zu trennenden Substanzen sind: Indol und 2-Methylindol.

Tabelle 4

Ergebnisse der Trennung von Indol und 2-Methylindol in Heptan

Substanz	Retentionszeit (min)
1,3,5-Tri-tert.- butylbenzol (Standard)	1,86
Indol	9,12
Indol / 2- Methylindol	8,98 / 7,37
2-Methylindol	7,20

Beispiel 10

Trennung von Indol und 2-Naphthol in Heptan

Der Versuch wird wie in Beispiel 10 beschrieben durchgeführt.

Tabelle 5

Ergebnisse der Trennung von 2-Naphthol und Indol in Heptan

5	Substanz	Retentionszeit (min)
10	2-Naphthol	2,24
15	2-Naphthol / Indol	1,92 / 9,16
20	Indol	9,12

25

Beispiel 11

Trennung eines Enantiomergemisches: racemisches 1-(2-Naphthyl)-ethanol

Der Versuch wird analog zu Beispiel 10 durchgeführt. In diesem Beispiel liegt der Druck bei ca. 70 bar. Die Konzentration der Proben beträgt 0,25 mg/ml Lösungsmittel.

30

Tabelle 6

Ergebnisse der Trennung von racemischem 1-(2-Naphthyl)-ethanol in Heptan

35

	Substanz	Retentionszeit (min)
40	1,3,5-Tri- <i>tert.</i> - butylbenzol (Standard)	1,89
45		
50	S-(-)-1-(2- Naphthyl)- ethanol	32,03
55		
60	1,3,5-Tri- <i>tert.</i> - butylbenzol (Standard)	1,87
65		
	R-(+)-1-(2- Naphthyl)- ethanol	36,30

1. Verfahren zur chromatographischen Trennung von Stoffgemischen unter Einsatz von sphärischen Mikropartikeln aus chemisch und physikalisch unmodifizierten, wasserunlöslichen, linearen Polysacchariden.
2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die Trennungen säulenchromatographisch durchgeführt werden. 5
3. Verfahren nach Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, daß die Trennungen mit Hilfe von HPLC (Hochleistungs- (oder) Hochdruckflüssigkeitschromatographie) durchgeführt werden.
4. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, daß die Stoffgemische Stereoisomere sind. 10
5. Verfahren nach Anspruch 4, dadurch gekennzeichnet, daß die Stoffgemische Enantiomere sind.
6. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 5, dadurch gekennzeichnet, daß die Mikropartikel einen Durchmesser von 10 nm bis 100 µm aufweisen.
7. Verfahren nach Anspruch 6, dadurch gekennzeichnet, daß die Mikropartikel einen Durchmesser von 1 µm bis 5 µm aufweisen. 15
8. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 7, dadurch gekennzeichnet, daß als Polysaccharide Poly-(1,4- α -D-glucane) eingesetzt werden.
9. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 8, dadurch gekennzeichnet, daß Polysaccharide eingesetzt werden, die durch einen biotechnischen Prozeß herstellbar sind.
10. Verwendung von sphärischen Mikropartikeln aus linearen Polysacchariden zur chromatographischen Trennung von Stoffgemischen. 20

Hierzu 2 Seite(n) Zeichnungen

25

30

35

40

45

50

55

60

65

- Leerseite -

Fig. 1a (5000x)

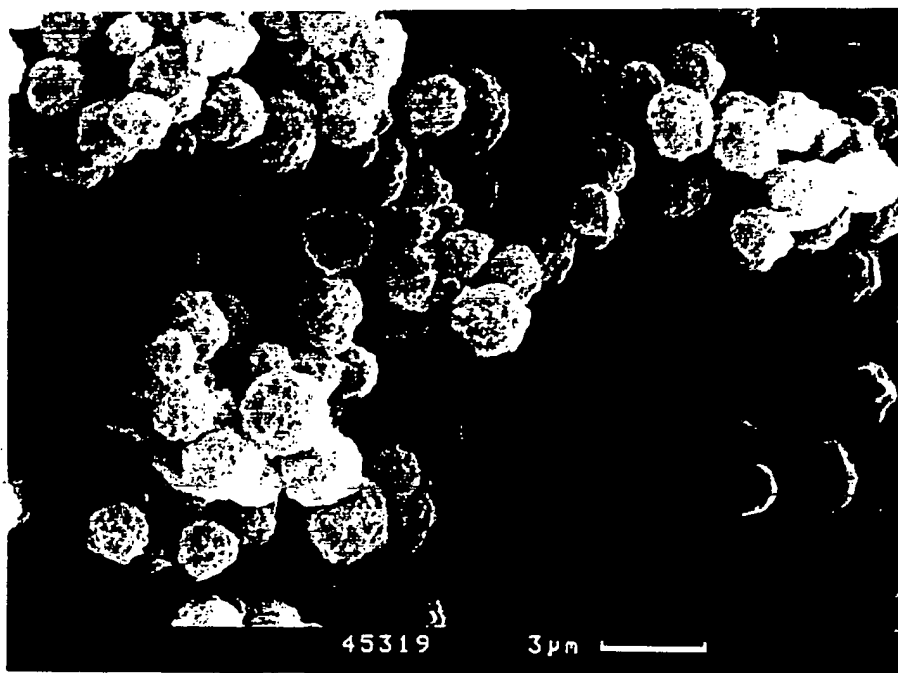


Fig. 1b (10000x)

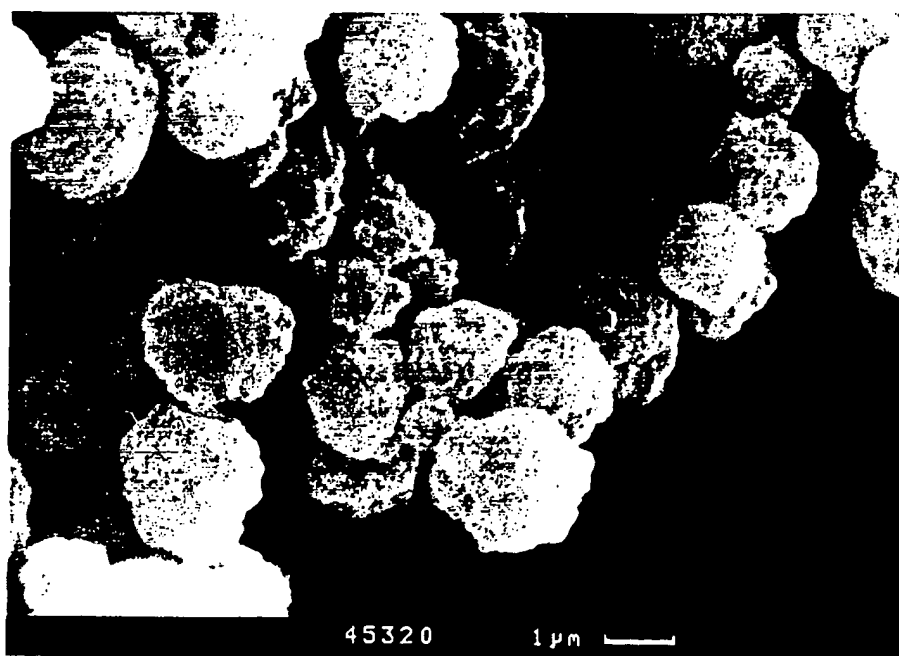


Fig. 1c (5000x)

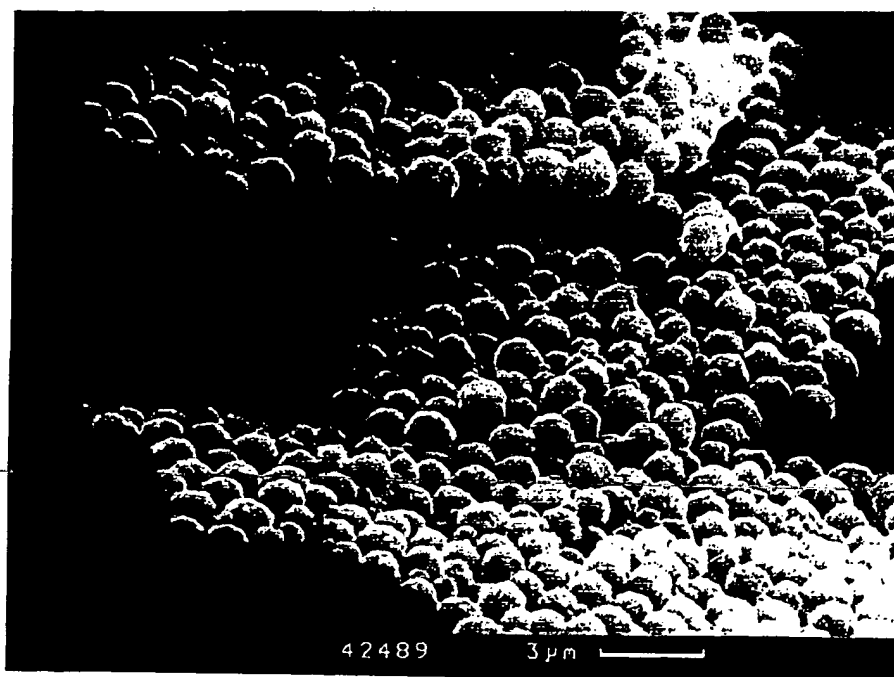


Fig. 1d (20000x)

